

III. MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Plant Protection Section (PPS) PT. Arara Abadi Perawang, Desa Pinang Sebatang, Kecamatan Tualang, Kabupaten Siak. Penelitian ini dilaksanakan selama 4 bulan dimulai pada bulan Juli 2017 sampai November 2017.

3.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : lampu bunsen, pipet volume, jarum ose, spatula, *weighing dishes*, cawan petri ukuran 90 mm, erlenmeyer, *scalpel* ukuran 1 cm, timbangan digital, *magnetic stirrer*, *microwave*, autoklaf, inkubator, *laminar air flow cabinet*. Bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain adalah: isolate *Fusarium*, tanaman *A. crassicaarpa* yang berumur 3 bulan, media Potato Sukrose Agar (PSA) (kentang 200 gram, glukosa 20 gram, agar 20 gram), alkohol, aquades.

3.3. Metode Penelitian

Rancangan percobaan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 27 perlakuan dan 3 ulangan. Di mana setiap ulangan terdiri dari 5 tanaman. Sehingga total bibit yang digunakan 405 bibit *Acacia crassicaarpa*.

Perlakuan terdiri atas :

K₀ = Kontrol negatif

K₁ = Kontrol positif

F₁ : *Fusarium* 0129C

F₂ : *Fusarium* 0132C

F₃ : *Fusarium* 0133C

F₄ : *Fusarium* 0135C

F₅ : *Fusarium* 0136C

F₆ : *Fusarium* 0138C

F₇ : *Fusarium* 0139C

F₈ : *Fusarium* 0140C

F₉ : *Fusarium* 0141C

F₁₀ : *Fusarium* 0143C

F₁₁ : *Fusarium* 0144C

F₁₂ : *Fusarium* 0145C

F₁₃ : *Fusarium* 0146C

F₁₄ : *Fusarium* 0147C

F₁₅ : *Fusarium* 0148C

F₁₆ : *Fusarium* 0149C



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.

F₁₇ : *Fusarium* 0150C
F₁₈ : *Fusarium* 0151C
F₁₉ : *Fusarium* 0152C
F₂₀ : *Fusarium* 0154C
F₂₁ : *Fusarium* 0155C
F₂₂ : *Fusarium* 0156C

F₂₃ : *Fusarium* 0157C
F₂₄ : *Fusarium* 0158C
F₂₅ : *Fusarium* 0159C

3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan terlebih dahulu dilakukan proses sterilisasi di dalam oven. Tujuan dari sterilisasi adalah agar tidak terjadinya kontaminasi.

3.4.2. Sampel Bibit *A. crassicarpa*

Klon *A. crassicarpa* yang diuji terhadap ketahanan penyakit Layu *Fusarium* diperoleh dari lahan pertanaman nurseri PT. Arara Abadi Perawang yang berumur 2 bulan

3.4.3. Uji Hypovirulen

1. Pada pangkal batang tanaman *A. crassicarpa* dilukai dengan *scalpel* sepanjang ± 3 cm
2. Satu inokulum dengan diameter ± 5 mm ditempelkan ke dalam luka dengan miselium menghadap ke dalam dan ditekan sampai terjadi kontak sempurna dengan jaringan *A. crassicarpa*.
3. Bagian yang diinokulasi lalu dibalut dengan kapas kemudian ditutup dengan parafilm, inkubasi dilakukan selama 1 bulan.

3.4.4. Ekstraksi dsRNA Isolat Cendawan *Fusarium*

Ekstraksi dsRNA bertujuan untuk mengetahui isolate *Fusarium* bersifat hipovirulen disebabkan oleh virus. Ekstraksi dsRNA dilakukan seperti yang dijelaskan oleh Morris dan Dodds (1979) dengan beberapa modifikasi.

- a. Isolat yang telah ditumbuhkan di media cair kemudian dibekukan di dalam nitrogen cair, selanjutnya dijadikan bubuk halus dengan menggunakan mortar .

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

- b. RB buffer 500 μ L ditambahkan untuk membentuk bubur, dan dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuge ukuran 1,5 mL, dan diletakkan pada es batu.
- c. Menambahkan 5 μ l *β -mercaptoethanol* kemudian divortex. Emulsi disentrifugasi pada 12000 rpm selama 3 menit.
- d. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifuge yang baru, dan ditambahkan etanol 70 % sebanyak 900 μ l, lalu campuran tersebut diguncang secara perlahan. Kemudian campuran dipipet untuh di pindahkan di RB kolom kemudian disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit, buang fase air yang berada dibawah. Kemudian masukkan lagi campuran yang tersisa kedalam RB kolom yang sama, kemudian sentrifugasi lagi 12.000 rpm, kemudian fase air yang berada di bawah dibuang.
- e. DNase 100 μ l ditambahkan kedalam RB kolom, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit.
- f. Menambahkan 400 μ l WI Buffer ke dalam RB kolom dan dilanjutkan dengan disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit, lalu fase air dibuang.
- g. Wash buffer dimasukkan kedalam RB kolom sebanyak 600 μ l kemudian sentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit, lalu fase air dibuang. Proses ini dilakukan sebanyak 2 kali. Lalu RB kolom disentrifugasi kembali 12.000 rpm selama 3 menit.
- h. Saringan RB kolom dimasukkan dalam tabung mikrosentrifuge yang baru, lalu ditambahkan *RNase-free Water* sebanyak 50 μ l tepat di bagian tengah saringan dan diinkubasi selama 3 menit pada suhu ruang.
- i. RB kolom disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit untuk mendapatkan RNA murni.

3.4.5. Visualisasi Hasil Ekstraksi RNA (Elektroforesis)

Gel agarosa 0,5 % dibuat dengan melarutkan 0,5 g agarosa dalam 50 mL buffer TAE-DEPC 1x dipanaskan hingga mendidih, kemudian ditambahkan 4 μ l *ethidiumbromida* kemudian didinginkan sehingga suhunya menjadi sekitar 40-50°C, lalu dituang pada cetakan gel dan dibiarkan hingga memadat. Gel agarosa

diletakkan dalam alat elektroforesis dan direndam dengan TAE-DEPC 1x. Sampel RNA 25 µl dicampur dengan *loading dye* sebanyak 5 µl. Campuran ini dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa sebanyak 12 µl lalu dielektroforesis dalam medan listrik 100 Volt selama 80 menit. sampai warna biru bromofenol biru bermigrasi mendekati batas akhir gel. Pita-pita RNA diamati dengan sinar ultra violet (UV) transluminator.

3.5. Pengamatan

3.5.1. Uji Hypovirulensi pada Tanaman

Parameter pengamatan yang diamati adalah :

1. Panjang Lesio

a. Lesio Luar (cm)

Panjang Lesio luar diukur dengan menggunakan mistar dari titik inokulasi sampai dimana lesio akhir terlihat. Pengukuran panjang lesio luar dilakukan pada umur tanaman 4 bulan setelah aplikasi

b. Lesio Dalam (cm)

Lesio dalam diamati dan diukur menggunakan mistar dari titik pertama terlihat adanya lesio sampai dimana lesio terakhir terlihat. Pengukuran panjang lesio dalam dilakukan pada umur tanaman 4 bulan setelah aplikasi

2. Arah Lesio

Pengamatan diamati dengan melihat arah lesio pada batang tanaman setiap dilakukannya pengamatan. Arah lesio diamati pada umur tanaman 4 bulan setelah aplikasi

3. Intensitas Serangan Penyakit

Intensitas serangan diamati sejak *A. Crassiacarpa* diinokulasi patogen. Intensitas serangan dihitung dengan menggunakan formula sebagai berikut :

$$\text{Intensitas serangan} = (n/N) \times 100\%$$

Keterangan :

n : Tinggi Lesio pada Tanaman

N : Tinggi Tanaman

4. Keparahan Penyakit (*Disease Severity*)

Keparahan penyakit diukur terhadap banyaknya tanaman yang mati setelah diinokulasikan dengan cendawan *Fusarium*

$$\text{Keparahan Penyakit} = (A/N) \times 100\%$$

3.5.2. Hasil Elektroforesis

Hasil elektroforesis berupa gambar pita-pita RNA yang diamati dibawah UV transluminator

3.6. Analisa Data

Data hasil percobaan dianalisis secara statistik menggunakan *software* SAS 9.1 dengan uji lanjut DMRT (*Duncan Multiple Range Test*).

Model linear Rancangan Acak Lengkap yang digunakan adalah:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Dimana :

$$i = 1, 2, 3, \dots, 25$$

$$j = 1, 2, 3$$

$$Y_{ij} = \text{isolate } Fusarium \text{ ke-} j \text{ yang memperoleh perlakuan ke-} i$$

$$\mu = \text{mean isolate } Fusarium$$

$$\tau_i = \text{pengaruh perlakuan ke-} i$$

$$\epsilon_{ij} = \text{pengaruh acak pada isolate } Fusarium \text{ ke-} j \text{ yang memperoleh perlakuan ke } i$$

Analisis disusun berdasarkan tabel ANOVA (*Analysis of varian*) sebagai berikut :

Tabel 3.1. Analisis Sidik Ragam

Sumber Keragaman (SK)	Derajat Bebas (DB)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah	F Hitung	F Tabel	
					0,05	0,01
P	p-1	JKP	KTP	KTP/KTG	-	-
Galat	(p)(r-1)	JKG	KTG	-	-	-
Total	rp-1	JKT	-	-	-	-



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Diarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Diarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

Keterangan:

$$\text{Faktor koreksi (FK)} = \frac{Y_{...}^2}{p \cdot r}$$

$$\text{Jumlah Kuadrat Total (JKT)} = \sum Y_{ijk}^2 - \text{FK}$$

$$\text{Jumlah Kuadrat Faktor P (JKP)} = \sum \frac{Y_{.j}^2}{p \cdot r}$$

$$\text{Jumlah Kuadrat Galat (JKG)} = \text{JKT} - \text{JKP}$$

Uji lanjut yang akan dilanjutkan adalah Uji Jarak Duncan (UJD) taraf 5%. Model Uji Jarak Duncan adalah sebagai berikut :

$$\text{UJD } \alpha = R\alpha(p, \text{DB Galat}) \times \sqrt{\text{KTG}/r}$$

Keterangan:

α : Taraf uji nyata

p : Banyaknya perlakuan

r : Banyaknya ulangan

KTG : Kuadrat Tengah Galat